

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.32.001

脂联素通过干扰 TLR4 介导的炎症反应抑制血管平滑肌细胞泡沫化*

尹延伟¹, 孙倩倩², 张英谦¹, 胡爱民³, 杨 芬¹, 石 进^{1△}(1. 空军总医院神经内科, 北京 100142; 2. 空军北京劲松干休所, 北京 100021;
3. 空军总医院急诊部, 北京 100142)

[摘要] **目的** 探讨脂联素(APN)抑制氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的血管平滑肌细胞(VSMCs)泡沫化是否与干扰 Toll 样受体 4(TLR4)及其介导的炎症反应相关。**方法** 组织贴块法培养 C57BL/6J 背景野生型及 TLR4 基因敲除(TLR4^{-/-})小鼠主动脉 VSMCs。油红 O 染色观察 VSMCs 内脂质聚积;酶法检测 VSMCs 内胆固醇水平;Western blot 检测 VSMCs TLR4 蛋白表达;ELISA 方法检测 VSMCs 培养液中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的表达。**结果** ox-LDL 刺激 VSMCs 48 h 显著诱导细胞泡沫化;ox-LDL 诱导 VSMCs 泡沫化过程中伴随着 TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 表达的上调;而对于 TLR4^{-/-}型 VSMCs,ox-LDL 刺激并不能有效诱导 VSMCs 泡沫化及 IL-6、TNF- α 表达上调;APN 显著抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫化,伴随着 TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 表达的下调。**结论** APN 可通过干扰 TLR4 介导的炎症反应抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫化。

[关键词] 脂联素;Toll 样受体 4;血管平滑肌细胞;泡沫细胞**[中图分类号]** R543.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)32-4465-03

Adiponectin inhibits foam cell formation of vascular smooth muscle cell by interfering TLR4-mediated inflammation reaction*

Yin Yanwei¹, Sun Qianqian², Zhang Yingqian¹, Hu Aimin³, Yang Fen¹, Shi Jin^{1△}

(1. Department of Neurology, Air Force General Hospital, Beijing 100142, China; 2. Jinsong Sanatorium of Beijing Air Force, Beijing 100021, China; 3. Department of Emergency, Air Force General Hospital, Beijing 100142, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether adiponectin(APN)inhibiting oxidized low density lipoprotein(ox-LDL)induced foam cell formation of vascular smooth muscle cells(VSMCs)is associated to interfere toll like receptor 4(TLR4)and its mediated inflammation reactions. **Methods** Primary VSMCs were isolated from the thoracic aorta of the male(C57BL/6J)wild-type mice and TLR4 knockout(TLR4^{-/-})mice. Oil red O staining was used to observe the intracellular lipid deposition in VSMCs;enzymatic assay was used to analyze the intracellular total cholesterol content in VSMCs;the expression of TLR4 in VSMCs was detected by Western blot;the levels of IL-6 and TNF- α in the VSMCs culture solution were quantified by using ELISA. **Results** Ox-LDL stimulating VSMC for 48 h significantly induced its foam cell formation, and this process was accompanied by the up-regulation of TLR4,downstream inflammatory factors IL-6 and TNF- α expression;however, in TLR4^{-/-} VSMCs, the ox-LDL stimulation failed to effectively induce the VSMC foam cell formation,as well as the expression up-regulation of IL-6 and TNF- α ;APN significantly inhibited the ox-LDL induced-VSMC foam cell formation, and down-regulated the expressions of TLR4, IL-6 and TNF- α . **Conclusion** APN could inhibit ox-LDL induced VSMC foam cell formation by interfering TLR4 mediated inflammation reaction.

[Key words] adiponectin;Toll like receptor 4;vascular smooth muscle cell;foam cell

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是多种心脑血管疾病发生的病理基础,其以泡沫细胞在血管内皮下的大量堆积并伴随致炎因子的过度表达为特征^[1]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)是泡沫细胞的主要来源细胞之一。之前有研究发现脂联素(adiponectin, APN)参与 AS 过程中 VSMCs 的迁移、增殖与表型转化^[2]。Toll 样受体 4(toll like receptor 4, TLR4)是启动免疫和炎性反应的重要膜受体,已证实激活 TLR4 介导的炎症反应可显著促进 VSMCs 的迁移、增殖与表型转化^[3-4]。本研究旨在探讨 APN 是否可通过干扰 TLR4 介导的炎症反应抑制 VSMCs 泡沫化,为动脉粥样

硬化的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6J 背景野生型小鼠购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心, C57BL/6J 背景 TLR4 基因敲除(TLR4^{-/-})小鼠购自上海南方模式生物科技发展有限公司, SPF 级饲养。实验用小鼠均为 8 周龄雄性小鼠,采用组织贴块法培养原代 VSMCs^[5]。将原代培养 VSMCs 分为对照组、ox-LDL 组和 APN+ox-LDL 组。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(FBS)、DMEM 细胞培养液、抗生素、胰酶购自美国 Hyclone 公司;氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)购自广州奕源生物有限公司;油红 O 染料、APN 购自美国 Aldrich Sigma 公司;抗 β -actin 单克隆抗体(小鼠抗)、抗 TLR4 单克隆抗体(小鼠抗)购自美国 Santa Cruz 公司;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉生物技术公司;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(IL-6 及 TNF- α)购自美国 R&D Systems 公司。

1.2 方法

1.2.1 油红 O 染色 用异丙醇配制 0.5% 的油红 O 贮存溶液,与蒸馏水按照 3:2 比例稀释成工作液。ox-LDL 刺激细胞 48 h 后将 VSMCs 用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,10% 多聚甲醛溶液固定 20 min,加入油红 O 工作液,闭光染色 30 min。60% 异丙醇溶液脱色后镜下观察。

1.2.2 胆固醇水平的检测 细胞内总胆固醇水平依据 Xue 等^[6] 的报道方法进行检测。ox-LDL 刺激细胞 48 h 后,将 VSMCs 收集到离心管中,加入 100 μ L 异丙醇萃取细胞内脂质成分。超声破碎,1 500 \times g 离心 10 min。收集上清液,采用酶法测定的方法检测细胞内胆固醇水平。结果根据细胞蛋白水平进行标准化。

1.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ox-LDL 刺激 VSMCs 48 h 后,常规提取细胞蛋白并定量检测。50 μ g 蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭液室温条件下封闭 2 h。加一抗溶液(小鼠抗 TLR4 单克隆抗体,1:1 000;小鼠抗 β -actin 单克隆抗体,1:1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 溶液洗膜 4 次,每次 10 min,加二抗溶液(辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG,1:2 000)室温孵育 2 h, TBST 溶液洗膜 4 次,每次 10 min,化学发光法曝光,Lab4.6 软件对扫描结果进行分析。

1.2.4 ELISA 检测 ox-LDL 刺激 VSMCs 48 h 后,收集培养液,每孔加入 50 μ L 检测稀释液 RD1N;分别设定标准孔、对照孔、待测样品孔(每孔加入 50 μ L);酶标板加上覆膜,室温孵育 2 h;弃去液体,洗涤液洗涤 5 次;每孔加入 100 μ L IL-1 β 欧联物,加盖新的覆膜室温下孵育 2 h;弃去液体,洗涤液洗涤 5 次;每孔加入 100 μ L 底物溶液,室温孵育 30 min,避光操作;每孔加入 100 μ L 终止液,轻轻晃动混匀;30 min 内用 ELISA 测定仪测定 450 nm 波长条件下每孔的光密度。

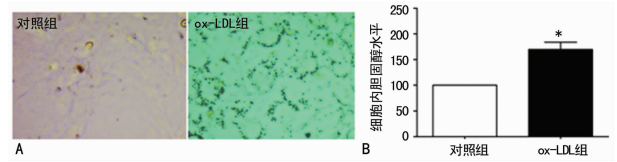
1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。每组实验至少重复 3 次。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 显著促进 VSMCs 泡沫化 由图 1 油红 O 染色可见 ox-LDL 刺激明显诱导 VSMCs 泡沫化(图 1A);此外,细胞内脂质测定结果也显示 ox-LDL 刺激显著增加 VSMCs 中胆固醇水平(图 1B),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

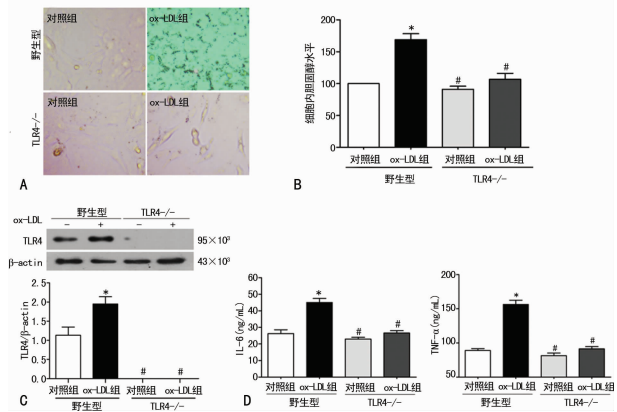
2.2 ox-LDL 通过激活 TLR4 介导的炎症反应促进 VSMCs 泡沫化 由图 2 可见 ox-LDL 刺激在显著诱导野生型 VSMCs 泡沫化的同时显著上调 TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达水平,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而对于 TLR4 -/- 型 VSMCs,ox-LDL 刺激并不能有效诱导细胞泡沫化,同时,ox-LDL 刺激也不能有效上调 TLR4 及其下游炎症因子 IL-

6、TNF- α 的表达,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。



A: 油红 O 染色; B: 胆固醇水平。*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 1 原代 VSMCs 泡沫化情况检测

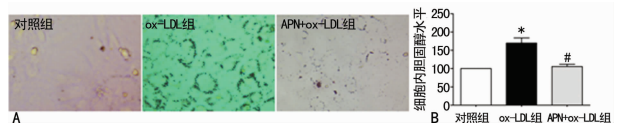


A: 油红 O 染色; B: 胆固醇水平; C: TLR4 表达; D: IL-6 及 TNF- α 表达。*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

图 2 原代 VSMCs 泡沫化情况及

TLR4、IL-6、TNF- α 表达水平的检测

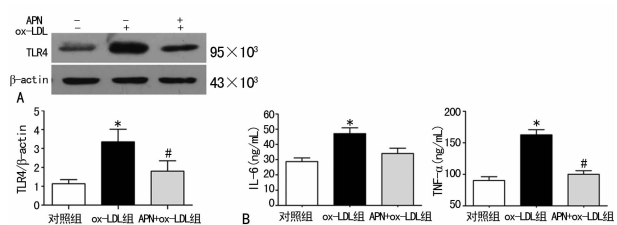
2.3 APN 抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫化 由图 3 可见 APN 预刺激 2 h 明显抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫化;此外,细胞内脂质测定结果也显示 APN 预刺激 2 h 显著抑制 ox-LDL 刺激引起的 VSMCs 内胆固醇水平增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A: 油红 O 染色; B: 胆固醇水平。*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

图 3 原代 VSMCs 泡沫化情况检测

2.4 APN 通过干扰 TLR4 介导的炎症反应抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫化 由图 4 可见 ox-LDL 刺激可显著上调 VSMCs TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达水平,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而用 APN 预刺激 VSMCs 2 h 后,ox-LDL 刺激并不能有效上调 TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。



A: TLR4 表达; B: IL-6 及 TNF- α 表达。*: $P < 0.05$, 与对照组比较; #: $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。

图 4 原代 VSMCs TLR4、IL-6、TNF- α

表达水平的检测

3 讨 论

目前, AS 目前已成为世界范围内严重威胁人类健康的重大公共卫生问题, 尽管其发生、发展涉及非常复杂的病理过程, 与年龄、性别、血脂异常、高血压、糖尿病、肥胖、吸烟、饮食、遗传、地理及气候等多种因素相关, 但关于 AS 确切的发病机制目前仍不十分明确^[7]。泡沫细胞在血管内皮下的大量沉积是 AS 的重要标志^[1]。以往的观点认为巨噬细胞是泡沫细胞的主要来源, 后来的研究显示, VSMCs 也具有在细胞内聚积脂质并呈现泡沫细胞样变的能力, 一些 AS 病变中的泡沫细胞实际上是发生了表型转化的 VSMCs^[8]。目前研究已证实 VSMCs 是中晚期 AS 病变中泡沫细胞的主要来源。因此, 对平滑肌源性泡沫细胞形成的干预是延缓 AS 进程的重要环节。

以往观点认为, AS 是一种退行性疾病, 但近年来研究发现其同样是一种慢性炎症性疾病, AS 的发生与发展始终伴随着炎症反应^[9]。因此, 近年来大量研究开始从炎症角度出发探索 AS 的发病机制。TLR4 是广泛表达于人体细胞膜上的炎症相关蛋白分子, 通过核因子 κ B(NF- κ B) 激活或 JNK/SAPK 激活途径介导下炎症因子的表达, 进而激活人体内炎症反应。近年来研究发现 TLR4 介导的炎症反应在 VSMCs 的迁移、增殖与表型转化中发挥重要作用^[3-4]。在本实验中, 用 ox-LDL 诱导 VSMCs 泡沫化, 检测 TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达水平。研究发现 ox-LDL 刺激在明显诱导野生型 VSMCs 泡沫化同时显著上调 TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达水平, 说明 VSMCs 泡沫化过程中伴随着 TLR4 介导的炎症反应激活。为了进一步验证以上结果, 应用 ox-LDL 刺激 TLR4 -/- 型 VSMCs, 结果显示 TLR4 缺陷损害 ox-LDL 的促泡沫化作用, 这进一步说明 TLR4 介导的炎症反应在 VSMCs 泡沫化过程中的发挥重要作用。

APN 是一种由分化中的脂肪细胞分泌的细胞因子, 其不仅具有抗炎及改善胰岛素抵抗等活性, 在抗 AS 方面也发挥重要作用。在本实验中, 发现用 APN 预刺激 VSMCs 2 h 可显著抑制 ox-LDL 的促泡沫化作用, 说明 APN 在阻碍平滑肌源性泡沫细胞形成方面具有重要作用, 但其具体机制如何不得而知。有研究发现, APN 可能具有通过干扰 TLR4 介导的炎症反应进而抑制巨噬细胞源性泡沫细胞形成的作用^[10]。此外, APN 还可以通过抑制 VSMCs 迁移、增殖与表型转化对 AS 的发展起到阻碍作用^[2]。基于以上研究推测, APN 可能具有通过干扰 TLR4 介导的炎症反应进而抑制平滑肌源性泡沫细胞形成的作用。为了验证以上假设, 本文在前期实验基础之上进一步检测了 TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达水平, 研究发现 APN 预刺激显著抑制 ox-LDL 诱导的 TLR4 激活及其下游炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达水平, 说明 APN 可通过干扰 TLR4 介导的炎症反应抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫化。

综上所述, 本研究发现激活 TLR4 介导的炎症反应可促进

VSMCs 对脂质的摄取, APN 可通过干扰以上炎症过程抑制 VSMCs 对脂质的摄取进而阻碍泡沫细胞的形成, 进而在抗 AS 过程中发挥重要的作用。本研究从一个新的角度探讨了平滑肌源性泡沫细胞形成的分子机制。该研究将为 AS 的防治提供新的思路。

参考文献

- [1] Yu XH, Fu YC, Zhang DW, et al. Foam cells in atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta, 2013(424):245-252.
- [2] Stoletov K, Fang LH, Choi SH, et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish[J]. Circ Res, 2009, 104(8):952-960.
- [3] Zhang LL, Gao CY, Fang CQ, et al. PPAR γ attenuates intimal hyperplasia by inhibiting TLR4-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(3):484-493.
- [4] De Graaf R, Kloppenburg G, Kitslaar PJ, et al. Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like receptors 2 and 4[J]. Microbes Infect, 2006, 8(7):1859-1865.
- [5] 曹小洁, 张莉莉, 郭露, 等. oxLDL 通过 PPAR γ -ABCG1 通路促进血管平滑肌细胞泡沫化[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(4):325-329.
- [6] Xue JH, Yuan Z, Wu Y, et al. High glucose promotes intracellular lipid accumulation in vascular smooth muscle cells by impairing cholesterol influx and efflux balance [J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(1):141-150.
- [7] Galesloot TE, Janss LL, Burgess S, et al. Iron and hepcidin as risk factors in atherosclerosis: what do the genes say? [J]. BMC Genet, 2015, 16(1):79.
- [8] Doran AC, Meller N, Mcnamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(5):812-819.
- [9] Yin YW, Liao SQ, Zhang MJ, et al. TLR4-mediated inflammation promotes foam cell formation of vascular smooth muscle cell by upregulating ACAT1 expression [J]. Cell Death Dis, 2014(5):1574.
- [10] Wang M, Wang D, Zhang Y, et al. Adiponectin increases macrophages cholesterol efflux and suppresses foam cell formation in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Atherosclerosis, 2013, 229(1):62-70.

(收稿日期:2016-04-02 修回日期:2016-05-15)